家蝇抗菌肽 AMPs17 蛋白原核表达条件的优化及其抗真菌活性检测

杨隆兵，国果*，马慧玲，李　妍，赵欣宇，苏佩佩，张勇

（1.贵州医科大学 基础医学院，贵阳 550025；2.贵州医科大学 环境污染与疾病监控教育部重点实验室，贵阳 550025）

摘 要 目的：优化 AMPs17 重组蛋白的原核表达条件，分析重组蛋白的抗真菌活性。方法：比较不同的诱导温度(25 ° C, 28 ° C, 30 ° C, 32 ° C, 34 ° C)、异丙基硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)诱导浓度（0.025、 0.05、0.1、0.3、0.5、0.8、1.0mmol·L^{-1}）和诱导时间（12h、15h、18h、21h、24h）对 AMPs17 重组蛋白表达量的影响，筛选 AMPs17 重组蛋白的最佳表达条件；采用镍离子金属螯合剂亲和层析柱对重组蛋白进行纯化，SDS-PAGE 电泳和 ImageJ 图像分析系统对表达结果进行分析，Western bolt 对 AMPs17 重组蛋白鉴定，高效液相色谱分析重组蛋白的纯度，微量液体稀释法及菌落计数法检测其抗真菌活性。结果：在诱导温度为 32℃、IPTG 浓度为 0.05mmol·L^{-1} 的条件下诱导培养 15h，AMPs17 重组蛋白的表达量最高且最为稳定；HPLC 色谱仪分析显示 AMPs17 重组蛋白纯度可达到 90％以上；优化后的 AMPs17 重组蛋白能有效抑制白色念珠菌的生长。结论：本研究优化了家蝇抗菌肽 AMPs17 的诱导表达条件，获得了高表达、稳定且具有抗真菌活性的蛋白，为后续抗菌机制及应用研究提供一定的实验基础。

关键词：家蝇；AMPs17；原核表达；条件优化；抗真菌活性

Optimization of Prokaryotic Expression Conditions and Antifungal Activity Detection of Antibacterial Peptide AMPs17 Protein in Musca domestica

YANG Long-bing, GUO Guo*, MA Hui-ling, LI Yan, ZHAO Xin-yu, SU Pei-pei, ZHANG Yon

(1. *Basic Medical Sciences of Guizhou Medical University*,*Guiyang*550025 *China*; 2. *Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control*, *Ministry of Education*，*Guizhou Medical University*,*Guiyang*550025 *China*)

Abstract： Objective: To optimize the prokaryotic expression conditions of AMPs17 recombinant protein and analyze the antifungal activity of recombinant protein. Method: Compare different induction temperatures (25 ° C, 28 ° C, 30 ° C, 32 ° C, 34 ° C), isopropylthio-β-D galactoside (IPTG) induced concentration (0.025, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mmol·L-1) and induction time (12h, 15h, 18h, 21h, 24h) on the expression of AMPs17 recombinant protein, screening the optimal expression conditions of AMPs17 recombinant protein. The recombinant protein was purified by nickel ion metal chelator affinity chromatography column, and the expression results were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and ImageJ image analysis system. The recombinant protein of AMPs17 was identified by Western blot and the purity of the recombinant protein was analyzed by high performance liquid chromatography（HPLC）. The antifungal activity was detected by a micro liquid dilution method and a colony counting method. Results：The results showed that the expression of AMPs17 recombinant protein was the highest and the most stable when induced at 32 °C and IPTG concentration of 0.05 mmol·L^{-1} for 15h. The HPLC analysis showed that the purity of AMPs17 recombinant protein reached 90%. In addition, AMPs17 recombinant protein can effectively inhibit the growth of Candida albicans. Conclusion: The induction and expression conditions of antibacterial peptide AMPs17 were optimized, and proteins with high expression, stability and antifungal activity were obtained, which provided certain experimental basis for the follow-up antibacterial mechanism and application research.

Key words: Musca domestica; AMPs17; prokaryotic expression; condition optimization; antifungal activity
* 国家自然科学基金项目（No.81760647；No. 81560337）
**通讯作者，电子邮箱：guoguojsc@163.com

引言

近年来，随着抗生素的广泛滥用，使得许多微生物出现了多重耐药的现象，如病毒、细菌及真菌耐药性等[1-2]。在临床上，因个体免疫受损而感染致病性真菌的病人在逐年增加，其中以白色念珠菌感染最为严重[3]。念珠菌分离株的出现和抵抗现有治疗并导致严重疾病的侵袭性霉菌感染的持续存在突显了耐药性真菌感染的威胁，然而对于治疗及控制致病性真菌感染的药物研发和临床使用效果却不尽如人意[4]。因此，寻求新型高效的抗真菌药物已成为当前科研人员研究解决的重点问题。

抗菌肽（Antimicrobial Peptides，Amps）是一类由生物体免疫防御系统产生的小分子多肽，在无脊椎动物和脊椎动物的先天免疫系统中普遍存在[5-6]。抗菌肽不仅具有抗菌谱广，热稳定性好且不易产生耐药性等特点，而且还对病毒、肿瘤及癌细胞等具有很好的杀灭活性[7-10]。抗菌肽作为新的抗生素药物的潜力是目前研究的热点。近年来，全球从天然途径或通过人工改造合成已发现的抗菌肽超过 2200 条，约有 200 种肽作为抗菌或免疫调节剂正处于临床实验中。抗菌肽人乳铁蛋白（human lactoferrin 1）毒性低，静脉注射时无不良反应[13]，从链霉素发酵液中提取得到的环脂肽类达托霉素（daptomycin），能破坏细菌细胞膜，迅速杀死革兰氏阳性菌[14]，还有一些抗菌肽用作食品添加剂或兽药使用[15-16]。当前抗菌肽在实验和临床治疗中取得的良好效果，充分说明天然抗菌肽已经是研究和开发新型抗菌药物的一个有效途径。

家蝇是一种重要杂食性的病媒昆虫，生境中微生物种群极为复杂，能携带和传播超过 100 种人类和动物病原体， 但直至目前，鲜见家蝇因自身感染病原体而导致死亡现象发生，这要归功于其强大的先天性免疫系统[17-18]。研究显示，家蝇能够产生以attacin、cecropin、defensin、diptericin等为代表的抗菌肽分子抵御病原体的入侵。近年来围绕家蝇抗菌肽相关功能研究的工作不断深入开展，除了上述传统抗菌肽分子外，越来越多的全新类别的抗菌肽分子不断的被发现，它们具有的高效抑菌功能给研究人员带来了更大的惊喜。

AMPs17是课题组前期从微生物感染12h后构建的家蝇转录组数据库挖掘到的特异性高表达基因，其在Genebank上尚未有功能注释，是一未知功能基因。为进一步了解该基因编码的蛋白有无抗菌功能，我们分别用APD(Antimicrobial peptide Database)和CAMP（Collection of Anti-Microbial peptides）抗菌肽数据库中的 prediction 工具预测其是否具有抗菌活性或有无

可能成为抗菌肽。令人兴奋的是，两个数据库分别用4种不同算法（SVM、RF、ANN、DA）对该蛋白序列进行预测，得分值分别为1、0.944、1、1，均判定该蛋白为抗菌肽。因其分子量为17KD左右，故我们将该基因编码蛋白暂时命名为家蝇抗菌肽-17（Muscadomestica antibacterial pepitides-17），简称AMPs17。为了进一步探讨AMPs17的功能，课题组前期克隆了其cDNA全长并分析了表达特性[19]。本研究中，我们构建了pET-28a（+）-AMPs17重组质粒，转入大肠杆菌BL21（DE3）中诱导表达，对其影响诱导表达的因素进行优化，获得AMPs17蛋白的最佳表达条件；利用Western bolt对AMPs17重组蛋白鉴定，同时采用微量液体稀释法及菌落计数法检测其抗真菌活性.本研究结果为后续AMPs17的抗菌机制及应用研究奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及供试菌

宿主菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）、Transetta（DE3）Chemically Competent Cell 表达感受态细胞均购买于北京全式金生物技术有限公司，pET-28a（+）载体、白色念珠菌ATCC10231 均由贵州医科大学现代病原生物学重点特色实验室常规保存，*E.coli*［pET-28a（+）-AMPs17］是转化了 pET-28a（+）-AMPs17 的大肠杆菌。

1.1.2 主要试剂

BamHⅠ和 XhoⅠ限制性内切酶、Ex Taq 酶、DNA marker DL2000、质粒 DNA 提取试剂盒、T4 DNA ligase、DNA 凝胶回收试剂盒、彩色预染蛋白质分子量标准 marker（均购自大连宝生物 TaKaRa 公司）；溴化乙啶（EB）溶液、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、抗 His 单克隆鼠抗体、羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP（均购自索莱宝公司）；T_4DNA ligase 、His Band Purification Kit 试剂盒（Novagen 公司）；乙腈、甲醇、乙醇均购买于 Sigma 公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a（+）-AMPs17 重组质粒的构建及鉴定

利用 *Bam* HⅠ和 XhoⅠ限制性内切酶将目的基因 AMPs17 的 PCR 扩增产物与 pET-28a（+）载体质粒进行双酶切，37℃酶切 5h，将纯化后的 PCR 产物与表达载体 pET-28a（+）连接，16℃连接 18h，取 5μl 连接产物转入到大肠埃希菌 Transetta（DE3）表达感受态细胞中，利用含有卡那霉素的 LB 平板筛选阳性单克隆并进行菌液 PCR 鉴定和测序验证。

1.2.2 *E.coli*［pET-28a（+）-AMPs17］表达条件的优化

将鉴定正确的重组质粒 pET-28a（+）-AMPs17 转化到大肠杆菌 BL21（DE3）中，构建重组菌株 BL21 / pET-28a（+）-AMPs17。挑取鉴定过的阳性克隆菌接种于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中复苏过夜，次日按 1:100 体积比转种于含卡那霉素的 LB 培养基中，37℃、220rpm 条件下培养至 OD600＝0.6～0.8，取 0.5ml 菌液作为对照，使用以下不同的诱导条件进行优化表达后，对表达产物进行 12%SDS-PAGE 电泳鉴定，并运用 ImageJ 图像分析系统对 AMPs17 蛋白的表达量进行检测分析。即在 IPTG 终浓度为 0.05 mmol·L^{-1}，诱导温度分别为 25℃、28℃、30℃、32℃、34℃条件下诱导培养 24h 后取样；在 IPTG 终浓度为 0.05 mmol·L^{-1}，诱导温度为 32℃条件下分别诱导 12h、15h、18h、21h、24h 后取样；在 IPTG 终浓度分别为 0.025mmol·L^{-1}、0.05 mmol·L^{-1}、0.1 mmol·L^{-1}、0.3 mmol·L^{-1}、0.5 mmol·L^{-1}、0.8 mmol·L^{-1}、1.0 mmol·L^{-1}，32℃诱导培养 15h 后取样。(注（问题说明）：37℃虽然是大肠杆菌的最适生长温度，但在前期的预试验中，我们发现其表达量很低，且经过查阅文献发现 25～37℃诱导，外源蛋白易以活性存在，在 37℃或 37℃以上温度诱导表达，其表达含量并不高，且已形成包涵体。因此，综合考虑我们最终选择 25℃、28℃、30℃、32℃、34℃。)

1.2.3 AMPs17 重组蛋白诱导菌液的裂解及可溶性分析

按上述优化后的表达条件于 250ml 的锥形瓶中扩增培养，诱导目的蛋白表达，收集菌液，去上清，留沉淀，-80℃保存。

将收集的菌液重悬于裂解液中（每克湿菌加入 5ml 裂解液），经-80℃反复冻融 3 次后进行超声破碎（100W，超声 5 s，停止 5 s，循环 99 次），于 4℃、12000rpm、离心 20min，分装上清和沉淀备用。将经处理的上清和沉淀进行 12%SDS-PAGE 电泳鉴定，以确定 AMPs17 重组蛋白是上清表达或包涵体表达。

1.2.4 包涵体的溶解

将超声破碎的沉淀菌体重悬于 8M 尿素缓冲液中进行溶解，待其完全溶解后离心，弃沉淀留上清，将上清转移至透析袋中，于 200ml 6M 尿素的烧杯中透析 6h 后，加入 40ml 裂解液，继续透析 6h，此时浓度从 6M 降至 5M。再次加入裂解液将透析外液中的尿素浓度由 5M 递减至 4M、3M、2M 时透析时间更改为 12h，直至递减至 1M、0M。最后，收集透析袋中的液体，利用 0.45μm 滤器过滤后收集其液体备用。

1.2.5 AMPs17 重组蛋白的纯化

根据 His·Tag 的 Ni-IDA Agarose 蛋白纯化说明书进行纯化，将纯化收集的 AMPs17 蛋白用超滤管超滤脱去咪唑后进行 12％SDS-PAGE 鉴定。

1.2.6 AMPs17 重组蛋白的 Western bolt 鉴定（此部分为添加的内容）

用小鼠来源的抗 His 单克隆抗体为一抗（1：1000），羊抗小鼠 IgG-HRP（1：2000）为二抗，对纯化的 AMPs17 重组蛋白进行 Western blot 鉴定。

1.2.7 AMPs17 重组蛋白的质谱鉴定（此部分为添加的内容）

将 AMPs17 重组蛋白进行 12%SDS-PAGE 鉴定后，用考马斯亮蓝染色液和脱色液分别对其进行染色和脱色，切除目的蛋白条带置于 1.5ml EPP 管中，送往上海生工进行质谱测序。

1.2.8 AMPs17 重组蛋白的纯度检测

利用 Agilent 1260 LC 型高效液相色谱仪检测 AMPs17 蛋白的纯度，色谱柱为 C18 反向柱（4.6mm×250mm），流动相 A 为 0.1%TFA 的超纯水，流动相 B 为 0.1%TFA 的乙腈溶液，进样量为 10μl，柱温为 25℃，采用线性梯度法进行洗脱，梯度洗脱时 VA：VB＝70:30，30min 后 VA：VB＝5:95，流速为 1mL / min，紫外检测波长为 214nm。

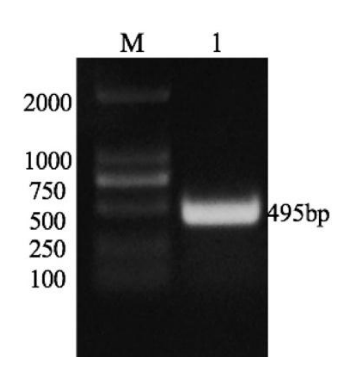
1.2.9 AMPs17 重组蛋白对白色念珠菌 MIC / MBC 的测定

参照美国临床实验室标准化委员会（CLSI）所采用微量液体稀释法及菌落计数法的评判标准作为本实验评判标准。将白色念珠菌 ATCC10231(*C. albicans* ATCC10231)在沙氏固体培养基（SDA）上接种 2-3 次后培养至对数生长期，挑选 3-5 个直径大于 1mm 的菌落放置于 NS 溶液中，利用细胞计数池将细胞浓度调至 1.0×10^6cfu/ml，然后再用沙氏液体培养液（SDB）将菌液浓度调至 1.0×10^3cfu/ml。于 96 孔板中加入菌液与不同浓度的 AMPs17 重组蛋白为实验组，氟康唑为阳性对照组，培养基为阴性对照组，于 37°C ,120 rpm 培养 24 h 后，各取 10 μl 菌液在 SDA 固体培养上涂板，于 37°C 培养 24 h 后观察，无真菌生长所对应的抗菌肽浓度为最小杀菌浓度(MBC)，然后在此基础上往后推一个孔即为最小抑菌浓度（MIC）。

2 结果

2.1.1 pET-28a（+）-AMPs17 重组质粒的鉴定

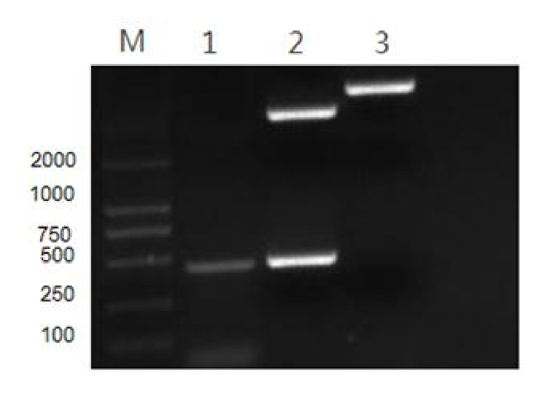
AMPs17 基因经 PCR 扩增后，获得了 495bp 左右的特异性条带，将 AMPs17 基因的 PCR 扩增产物与 pET-28a（+）载体进行双酶切，连接，成功构建 pET-28a（+）- AMPs17 重组质粒。将挑选的阳性克隆子送往上海生工进行测序鉴定，结果显示插入序列与目的基因 cDNA 序列一致，表明 AMPs17 基因原核表达重组质粒构建成功。（图 1、2）



M: DNA Marker；1: AMPs17 PCR 扩增产物

图 1 AMPs17 基因 cDNA 片段的产物

Fig.2 Amplification cDNA fragment of AMPs17 gene



M: DNA Marker；1: AMPs17 PCR 扩增产物；

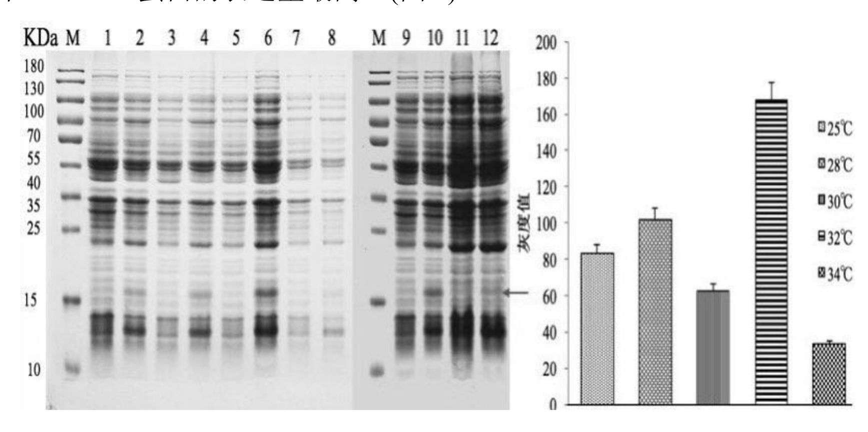
2: pET-28a（+）- AMPs17 重组质粒双酶切；3: pET-28a（+）- AMPs17 重组质粒

图 2 重组质粒 pET-28a（+）- AMPs17 双酶切鉴定图

Fig.2 Identification of recombinant plasmit pET-28a（+）- AMPs17 by endonuclease digestion

2.1.2 不同诱导温度对 AMPs17 蛋白表达量的影响

在 IPTG 终浓度为 0.05mmol·L^{-1}，诱导温度分别为 25℃、28℃、30℃、32℃、34℃的条件下诱导 24h 后进行 12%SDS-PAGE 电泳鉴定。结果表明：AMPs17 蛋白均有表达，通过 ImageJ 图像分析软件检测其灰度值分别为：83±4 、102±7、63±3、167±9、34±2，以在 32℃诱导条件下 AMPs17 蛋白的表达量最高。(图 3)



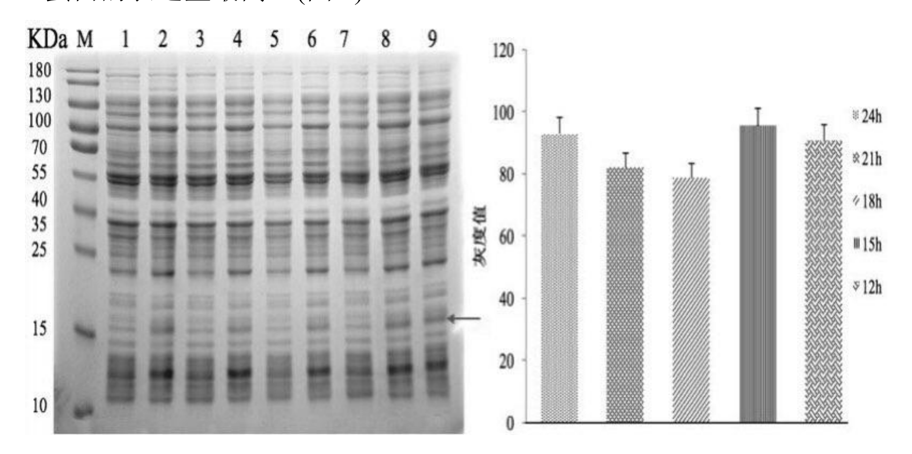
M 泳道：蛋白 Marker；第 2、4、6、8、10、12 泳道是：25℃， 28℃，32℃，34℃， 32℃，30℃诱导表达产物。

图 3 不同诱导温度对 AMPs17 蛋白表达量的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of the expression of AMPs17 protein at different induction temperatures

2.1.3 不同诱导时间对 AMPs17 蛋白表达量的影响

在诱导温度为 32℃，IPTG 终浓度为 0.05mmol·L-1 的条件下分别诱导 12h、15h、18h、21h、24h 后进行 12%SDS-PAGE 电泳鉴定。结果表明：AMPs17 蛋白均有表达，通过 ImageJ 图像分析软件检测其灰度值分别为：90±6、95±9、79±5、82±3、93±4，以在 15h 诱导条件下 AMPs17 蛋白的表达量最高。(图 4)



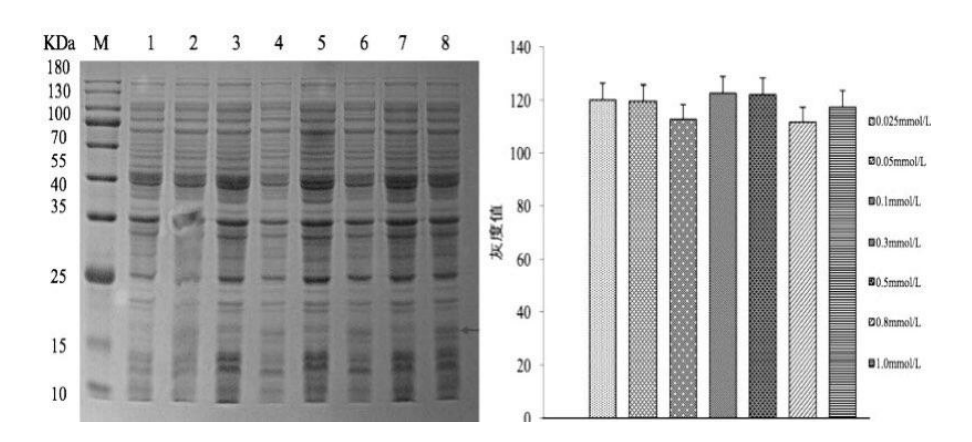
M 泳道：蛋白 Marker；第 2、4、6、8、9 泳道是：24h，21h，18h，15h，12h 诱导表达产物。

图 4 不同诱导时间对 AMPs17 蛋白表达量的 SDS-PAGE 分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the expression of AMPs17 protein at different induction times

2.1.4 不同诱导 IPTG 浓度对 AMPs17 蛋白表达量的影响

在诱导温度为 32℃， IPTG 终浓度分别为 0.025mmol·L^{-1}、0.05mmol·L^{-1}、0.1mmol·L^{-1}、0.3mmol·L^{-1}、0.5mmol·L^{-1}、0.8mmol·L^{-1}、1.0mmol·L^{-1} 的条件下诱导 15h 后进行 12%SDS-PAGE 电泳鉴定。结果表明：AMPs17 蛋白均有表达，通过 ImageJ 图像分析软件检测其灰度值分别为：120±4、119±3、112±8、122±2、121±3、111±9、117±6。IPTG 终浓度在 0.025～1.0mmol·L-1 范围内对 AMPs17 蛋白的表达量影响不明显。(图 5)



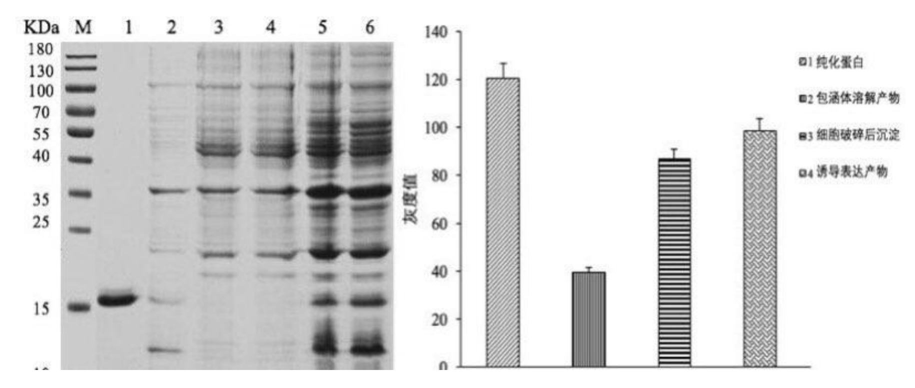
M 至 8 泳道：蛋白 Marker；未加 IPTG 诱导的全菌液的表达产物；加入诱导 IPTG 终浓度：0.025mmol·L-1、0.05 mmol·L-1、0.1 mmol·L-1、0. mmol·L-1、0.5 mmol·L-1、0.8 mmol·L-1、1.0 mmol·L-1 的诱导表达产物。

图 5 不同诱导 IPTG 浓度对 AMPs17 蛋白表达量的 SDS-PAGE 分析

Fig 5 SDS-PAGE analysis of the expression of AMPs17 protein at different IPTG concentrations

2.1.5 AMPs17 蛋白的诱导表达及纯化

将优化诱导表达后的表达产物经超声破碎、包涵体的溶解和纯化后，获得分子量为 17kDa 左右的 AMPs17 蛋白，通过 ImageJ 图像分析软件检测其灰度值分别为：120±6、39±4、86±3、98±5 。(图 6)



M 至 6 泳道顺序为：蛋白 Marker；纯化蛋白；包涵体溶解产物；未诱导表达产物；细胞破碎后上清；细胞破碎后沉淀；诱导表达产物。

图 6 AMPs17 蛋白的诱导表达及纯化

Fig 6 Induction expression and purification of AMPs17 protein

2.1.6 AMPs17 重组蛋白的 Western bolt 及质谱鉴定（此部分为添加的内容）

用小鼠来源的抗 His 单克隆抗体为一抗，羊抗小鼠 IgG-HRP 为二抗，对 AMPs17 重组蛋白进行 western blot 鉴定，结果获得一清晰条带，条带大小与预计相符（图 7），且经质谱鉴定分析显示，纯化蛋白序列与 AMPs17 序列一致（详见附录 A）。

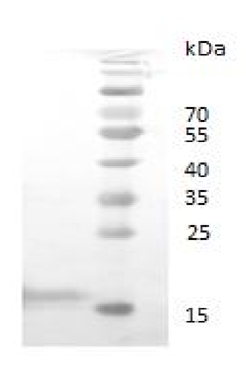


图 7　AMPs17 重组蛋白 His 标签鉴定图

Fig.7 Identification of AMPs17 protein by his-tag serum

2.1.6 AMPs17 蛋白的纯度检测

纯化后的 AMPs17 重组蛋白经高效液相色谱仪分析，主峰显示为一单峰，说明杂质较少，提示其纯度很纯，可达 90%以上。（图 8）

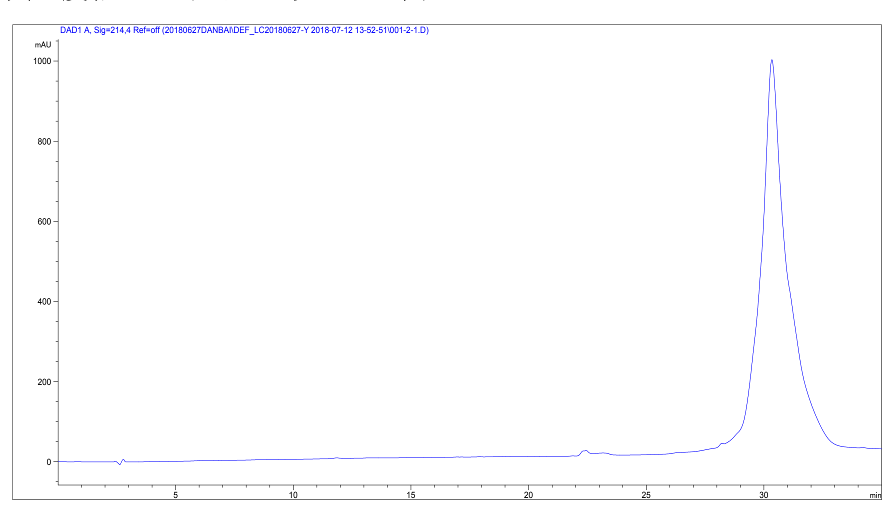


图 8 AMPs17 蛋白的纯度测定

Fig 8 Determination of purity of AMPs17 protein

2.2 AMPs17 蛋白的抗真菌活性检测

2.2.1 AMPs17 蛋白对白色念珠菌 MIC / MBC 的测定

AMPs17 重组蛋白作用于白色念珠菌 24h 后，检测结果显示其 MIC 值为 20 μg·mL^{-1}，MBC 值为 40 μg·mL^{-1}，具有较好的抗真菌活性。

表 1 AMPs17 蛋白的抗真菌活性检测

Table 1 Detection of antifungal activity of AMPs17 protein

菌株	MIC（μg·mL^{-1}）		MBC（μg·mL^{-1}）	
	AMPs17	FLC	AMPs17	FLC
C. albicans ATCC10231	20	3.125	40	6.25

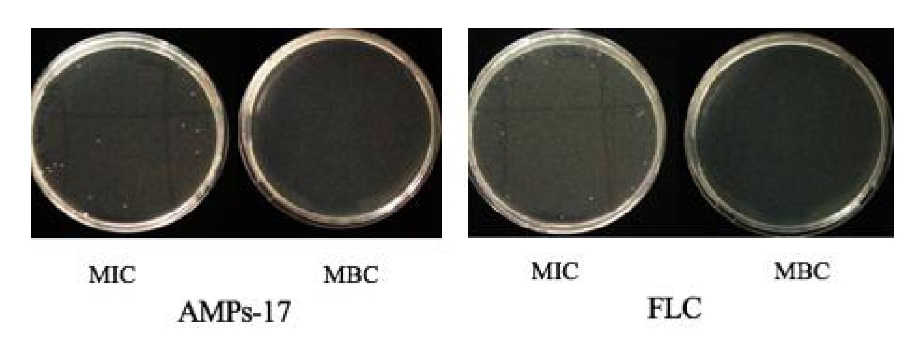


图 9 AMPs17 蛋白的抗白色念珠菌活性

Fig 9 Anti-C. albicans activity of AMPs17 protein

（注：本文只对 AMPs17 抗白色念珠菌的活性进行研究，是因为在另一篇文章中我们对 AMPs17 的抗菌谱进行了研究（待发稿）。因此，本文只能对白色念珠菌进行研究。谨请您谅解，谢谢您的宝贵建议。）

3 讨 论

研究表明异源蛋白的表达在很大程度上受细胞生长速率的严重影响。通常情况下，融合蛋白的活性及其可溶性与宿主细胞自身蛋白酶和折叠辅助蛋白的存在与否，以及合适的载体配置和培养条件密切相关[20]。因此，一个高效、稳定的表达体系对抗菌肽的表达有着极其重要的作用。大肠杆菌原核表达系统作为当前应用最为广泛的表达系统，它不仅操作简单、转化效率高、成本低廉且表达的产物水平要远高于其他表达系统[21]。因此，本课题组选用了最常用的 pET-28a（+）作为表达载体，大肠埃希菌 BL21（DE3）作为表达宿主菌，成功获取了 pET-28a（+）-AMPs17 重组表达质粒。

大肠杆菌原核表达体系中，除了表达载体、表达宿主菌的合理选择外，诱导温度、时间、IPTG 终浓度对目的蛋白的表达也尤为重要[22]。在成功表达家蝇抗菌肽 AMPs17 重组蛋白的基础上，本研究分别对诱导温度、时间、IPTG 终浓度进行了研究。结果我们发现，AMPs17 蛋白在诱导温度为 32℃时其表达量最高，在 34℃、30℃、28℃、25℃时蛋白表达量呈现出下降趋势。一般而言，诱导温度在 25℃～37℃条件下，外源蛋白易于形成且具有较好的活性，但在较低的诱导温度条件下可对肠杆菌的生长不利且造成包涵体的形成[23]。因此，在最适的诱导温度下，可利于菌体的生长且易于外源蛋白的表达。在诱导时间 15h 的条件下目的蛋白的表达量最高且随着时间的延长或缩短其表达量呈现不同程度的下降。对于诱导后的培养时间，不同的启动子或表达载体在诱导表达时间上也各不相同，例如启动子 P_{tac} 和 P_{lac} 仅需要 2～3h 就可以完成表达，而 P_{R}、P_{trp} 等则需要较长的诱导时间[24]。在不同的 IPTG 终浓度条件下，其浓度的高低对 AMPs17 蛋白的表达量没有明显的影响，因此本研究在降低 IPTG 浓度对细菌代谢的毒性作用和降低实验成本的提前下，我们确定了其最低有效诱导终浓度为 $0.05mmol\cdot L^{-1}$，在实验过程中我们发现本研究的实验结果与彭传林[25]研究具有相似现

象。AMPs17 重组蛋白经镍离子金属螯合剂亲和层析柱纯化后在 12%SDS-PAGE 电泳中呈现单一的目的蛋白条带，HPLC 分析主亦显示为单一峰形，提示纯化效果较好，纯度可达 90%以上。体外抗真菌活性检测结果显示， AMPs17 重组蛋白具有抑杀 *C. albicans* 的作用，其 MIC 和 MBC 值分别为 20 μg·mL^{-1}、40 μg·mL^{-1}，证实了 AMPs17 的抗真菌活性，亦表明所构建的原核表达系统可以有效表达具有活性的 AMPs17 蛋白。

本研究优化了 AMPs17 的原核表达条件，获得了具有抗真菌活性的 AMPs17 重组蛋白。为后续 AMPs17 蛋白的研发应用及抗真菌机制的研究提供可靠的实验技术基础。

参考文献

[1] Martens E, Demain A L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States[J]. Journal of Antibiotics, 2017, 70(5):520-526.

[2] Bernard E, Kreis B, Lotte A, et al. Tuberculosis in Pregnancy.[J]. Clinics in Perinatology, 2016, 4(2):880.

[3] 李秀云. 盐酸氨溴索与氟康唑联合对抗耐药白色念珠菌的作用及机制研究[D]. 山东大学, 2017.

Li X Y. The effect and mechanism of ambroxol hydrochloride combined with fluconazole against Candida albicans [D]. Shandong University, 2017.

[4] Yeaman M R, Büttner S, Thevissen K. Regulated Cell Death as a Therapeutic Target for Novel Antifungal Peptides and Biologics:[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2018,(2018-4-26), 2018, 2018:1-20.

[5] Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(Database issue):D1087-D1093.

[6] Kounatidis I，Ligoxygakis P.Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection [J].Open Biology，2012，2(5)：120075.

[7] Panteleev P V, Balandin S V, Ivanov V T, et al. A Therapeutic Potential of Animal Î²-hairpin Antimicrobial Peptides[J]. Current Medicinal Chemistry, 2017, 24(17):-.

[8] Park J, Kang H K, Choi M C, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of analogues derived from the antimicrobial peptide mBjAMP1 isolated from Branchiostoma japonicum[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018.

[9] Lyu Y, Yang Y, Lyu X, et al. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria andCandida[J]. Scientific Reports, 2016, 6:27258.

[10] Zhou J, Kong L, Fang N, et al. Synthesis and Functional Characterization of MAF-1A Peptide Derived From the Larvae of Housefly, Musca domestica (Diptera: Muscidae)[J]. Journal of Medical Entomology, 2016, 53(6):1467-1472.

[11] Miduranowaczek K, Markowska A. Antimicrobial Peptides and Their Analogs: Searching for New Potential Therapeutics[J]. Perspectives in Medicinal Chemistry, 2014, 6(6):73-80.

[12] Li SM, Hao LL, Bao WG, et al. A novel short anionic antimicrobial peptide isolated from the skin of Xenopus laevis with broad anti- microbial activity and inhibitory activity against breast cancer cell. Arch Microbiol,2016,198(5):473–482.

[13] Blijlevens Nicole MA, van Iersel Thijs MP, van der Velden Walter JFM, Donnelly J Peter. Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin1-11(hLF1-11). BMC medicine ,2009,7:44.

[14] Mehta S, Singh C, Plata KB, Chanda PK, Paul A, Riosa S, Rosato RR, Rosato AE.beta-Lactams Increase the Antibacterial Activity of Daptomycin against Clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains and Prevent Selection of Daptomycin-Resistant Derivativ. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012,56（12）： 6192-6200.

[15] David J Craik, David P Fairlie, Spiros Liras, David Price. The future of peptide-based drugs. Chemical Biology and Drug Design, 2013,81（1） :136-147.

[16] A Matejuk, Q Begum, MC Woodle .Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. Drugs Future, 2010,35(3):197-231.

[17] J.G Scott, N Liu, M Kristensen, A G Clark. A case for sequencing the genomeof Musca domestica (Diptera: Muscidae). Journal of Medical Entomology,2009， 46（2） , 175-182.

[18] Ai H, Wang F, Zhang N, Zhang L, Lei C. Antiviral, immunomodulatory,and freeradical scavenging activities of a protein-enriched fraction from the larvae

of the housefly,Musca domestica . Journal of Insect Science， 2013， 13(112)： 112

[19] 陶如玉, 李妍, 马慧玲,等. 家蝇 AMP17 基因的克隆及其分子特性和表达模式研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2017(11):1079-1083.

Tao R Y, Li Y, Ma H L, et al. Cloning and molecular characteristics and expression patterns of AMP17 gene in Musca domestica[J]. Chinese Journal of Pathogenic Biology, 2017(11): 1079-1083.

[20] 王中原. 可溶性人 SUMO 融合表达系统的研究[D]. 吉林大学, 2010.

Wang Z Y. Study on soluble human SUMO fusion expression system [D]. Jilin University, 2010.

[21] Nuc P, Nuc K. [Recombinant protein production in Escherichia coli].[J]. Postepy Biochem, 2006, 52(4):448-456.

[22] Gao Q, Zhao JM, Song LS, et al. Molecular cloning, characterization and expression ofheat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop Argopecten irradiants[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(4):379-385.

[23] Liang R, Liu X, Liu J, et al. A T7-expression system under temperature control could create temperature-sensitive phenotype of target gene in Escherichia coli.[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(3):497-506.

[24] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报:自科版, 2008, 5(3):77-82.

Xie T B. Research progress of E. coli expression system[J]. Journal of Yangtze University: Self version, 2008, 5(3): 77-82.

[25] 彭传林. 家蝇抗真菌肽 MAF-1 原核表达体系优化与活性分析[D]. 贵阳医学院, 2015.

Peng C L. Optimization and activity analysis of prokaryotic expression system of Musca domestica antifungal peptide MAF-1 [D]. Guiyang Medical College, 2015.